

09/284114

PCT/JP 97/03591

日 本 国 特 許 庁

07.10.97

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

01 DEC 1997

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1996年10月 8日

出 願 番 号  
Application Number:

平成 8年特許願第267126号

出 願 人  
Applicant (s):

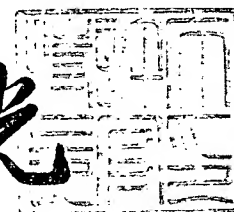
科学技術振興事業団  
財団法人東京都老人総合研究所

PRIORITY DOCUMENT

1997年11月14日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Patent Office

荒井 寿光



出証番号 出証特平09-3092152

【書類名】 特許願

【整理番号】 P96-0231

【提出日】 平成 8年10月 8日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A01K 67/027

【発明の名称】 自己免疫性関節炎を自然発症するマウス

【請求項の数】 1

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都板橋区東新町 1-1-1-603

    【氏名】 坂口 志文

【特許出願人】

    【識別番号】 396020800

    【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

    【代表者】 理事長 中村 守孝

【特許出願人】

    【識別番号】 594053121

    【氏名又は名称】 財団法人 東京都老人総合研究所

    【代表者】 理事長 茅野 祐子

【代理人】

    【識別番号】 100091096

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 平木 祐輔

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 015244

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

特平 8-267126

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 自己免疫性関節炎を自然発症するマウス

【特許請求の範囲】

【請求項1】 自己免疫性関節炎を自然発症するという形質を有し、かつその形質の遺伝形式が常染色体優性遺伝であることを特徴とするマウス。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、突然変異によって生じたマウスに関する。本発明のマウスは、ヒトに発症するリウマチ性関節炎に酷似した病態を自然発症するので、該疾患のモデルマウスとして有用である。

【0002】

【従来技術】

自己免疫病のなかでも、リウマチ性関節炎は、最も頻度の高い疾患であり、例えば、米国での罹患者は約650万人にも達する。この疾患の原因、発症機構は、現在のところ不明といってよい。

【0003】

このような疾患の発症機構の解明のためには、その疾患に酷似した病態を自然発症するモデル動物が有用である。リウマチ性関節炎と同様に自己免疫性の疾患である自己免疫性糖尿病については、既に、NODマウスと呼ばれる有用なモデル動物が開発されており (Makino, Sら Exp. Animals (Tokyo) 29, 1-13, 1980. )、該疾患の原因、発症機構の解明に、おおいに寄与している。

【0004】

リウマチ性関節炎に関しても、該疾患に類似した病態を示すモデル動物が既にいくつか知られている。例えば、MRL-lpr/lpr マウスは、主として足関節に関節炎が自然発症する (Hang, L.ら J. Exp. Med. 155: 1690, 1982)。しかし、同マウスの関節炎は一般に軽度であり、しかもリンパ節の異常増殖性腫張により長時間の維持が困難であるため、関節炎モデルとして広く用いられるには至っていない。また、関節に多いII型コラーゲンを強力なアジュバントとともにマウスに免疫して

発症させるコラーゲン関節炎 (Stuart, J.M.ら Annual Rev. Immunol. 2:199, 1984.)、結核死菌をラットに免疫して誘導するアジュバント関節炎 (Taurog, J.D.ら Cell. Immunol. 75:271, 1983) などはリウマチ性関節炎と類似した病態を示す。しかしながら、ヒトのリウマチ性関節炎でII型コラーゲンの異常、また結核菌の感染との関係は証明されていない。従って、これらのモデル動物を用いて得られた知見が、必ずしも、ヒトに外挿できるとは限らず、ヒトのリウマチ性関節炎のモデルと成り得るかが疑問視されている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

リウマチ性関節炎の治療法の開発のためにも、ヒトのリウマチ性関節炎と同じように自然発症し、リウマチ性関節炎の免疫病理学的特徴を備えたモデル動物が必要である。本発明は、かかる要望に応えるものであり、その目的とするところは、ヒトのリウマチ性関節炎と酷似した病態を自然発症するヒト疾患モデルマウスを提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記課題を解決するため、鋭意検討を重ねた結果、正常BALB/cコロニーの中に、関節腫張のみられるマウスを見出し、この知見に基づき本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、自己免疫性関節炎を自然発症するという形質を有し、かつその形質の遺伝形式が常染色体優性遺伝であることを特徴とするマウスである。

【0007】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のマウスは、自己免疫性関節炎を自然発症し、かつそれが常染色体優性遺伝する点に特徴がある。自己免疫性関節炎の発症時期は、個体間で差異があるが、通常生後3カ月～4カ月程度で発症する。従来技術の欄で述べたように、自己免疫性関節炎を自然発症するマウスとしては、MRL-lpr/lpr マウスが知られている。この MRLマウスの関節炎は常染色体劣性遺伝を示し、常染色体優性遺伝を示す本発明のマウスとは遺伝形式が異なる。MRLマウスの関節炎は、一般に後肢

関節に局限しており、慢性に進行しても関節硬直に至ることはないが、本発明のマウスの関節炎は前肢後肢の関節に発症し、慢性的に進行の後、関節硬直に至る。また、本発明のマウスでは、MRLマウスに見られるリンパ球の異常増殖は見られない。

【0008】

本発明のマウスは、自己免疫性関節炎を自然発症するという特徴があるが、この他にも、BALB/c系統の遺伝的に純系であるマウスに自然発症するため、さまざまな実験（例えば、薬剤の効果検定）に市販の正常BALB/cを対照として使用できるという特徴もある。

【0009】

本発明のマウスにみられる自己免疫性関節炎は、ヒトに発症するリウマチ性関節炎と酷似した病態を示す。具体的には、以下のような類似点がある。

1) パンヌスの出現から関節軟骨、骨の破壊に慢性的に進行する点、リンパ球浸潤を伴う炎症性関節破壊である点で、病理組織学的にヒトのリウマチ性関節炎と酷似している（図9及び図11）。

【0010】

2) 臨床的に、前後肢大小関節が対称的に関節炎を起こす点、病変が慢性的に進行し、最終的に関節硬直に至る点で、ヒトのリウマチ性関節炎と似ている（図1、図3、図5、図7）。

【0011】

3) 血中リウマチ因子、及び関節に特異的であるII型コラーゲンに対する自己抗体が出現する点、また高ガンマグロブリン血症が高頻度に出現する点で、ヒトのリウマチ性関節炎と似ている（図14、図15、図16）。

【0012】

以上の類似点から、本発明のマウスは、ヒトのリウマチ性関節炎の疾患モデルマウスとして使用できる。

本発明のマウスの有する「自己免疫性関節炎を自然発症する」という形質の遺伝形式は、常染色体優性遺伝である。従って、自己免疫性関節炎を自然発症するマウスと正常のBALB/cマウスを交配することにより、自己免疫性関節炎を自然発

症するマウスを得ることができる。なお、本出願人は自己免疫性関節炎を自然発症するマウスを特許法施行規則第27条の3第1項の規定に準じて分譲する用意がある。

【0013】

【発明の実施の形態】

【0014】

【実施例】

〔実施例1〕

1993年、理化学研究所において、系統維持中のBALB/c（1992年、日本S L Cより購入）コロニー中に関節腫張のみられる雌マウスを見出した。この関節腫張は、遺伝的突然変異によるものと考え、その遺伝子の性質を調べるため、前記マウスを、正常なBALB/cマウス（日本S L Cより購入）と交配した。交配の結果、12個体のマウスが得られ、そのうち4個体（雌3匹、雄1匹）に関節腫張がみられた（関節炎発症率33%）。関節腫張がみられたマウスの中から任意の1個体を選抜し、これを再度正常なBALB/cマウス（日本S L Cより購入）と交配した。交配の結果、15個体のマウスが得られ、そのうち6個体（雌4匹、雄2匹）が関節腫張がみられた（関節炎発症率40%）。さらに、前記と同様に、関節腫張がみられたマウスの中から任意の1個体を選抜し、これを再度正常なBALB/cマウス（日本S L Cより購入）と交配した。交配の結果、28個体のマウスが得られ、そのうち10個体が関節腫張がみられた（関節炎発症率35%）。以上3代にわたる交配の結果、関節炎は、正常個体との交配により、雌雄共に30～40%の割合で発症している。従って、この関節腫張を引き起こす遺伝子の遺伝形式は、常染色体優性と考えられた。

【0015】

〔実施例2〕

関節炎を発症したマウス（6カ月齢）の前肢及び後肢を肉眼で観察した。前肢の写真を図1に、後肢の写真を図3にそれぞれ示す。また、対照として正常マウスの前肢及び後肢の写真を図2及び図4に示す。

図1及び図3が示すように、関節炎を発症したマウスの前肢及び後肢の関節に

は腫張がみられる。

【0016】

〔実施例3〕

関節炎を発症したマウス（6カ月齢）の前肢及び後肢のレントゲン写真を撮影した。前肢の写真を図5に、後肢の写真を図7にそれぞれ示す。また、対照として正常マウスの前肢及び後肢の写真を図6及び図8に示す。

図5及び図7が示すように、関節炎による関節の破壊は、前肢及び後肢の大小の関節に対称的に生じている。

【0017】

〔実施例4〕

関節炎を発症したマウス（5カ月齢）の後肢部分の関節を10%ホルマリンで3日間固定後、パラフィンに包埋し、これより作製した薄切切片をヘマトキシリンエオジンで染色した。また、正常マウスからも同様の切片を作製し、染色した。

【0018】

関節炎を発症したマウスの関節組織切片の顕微鏡写真を図9（倍率×40）及び図11（倍率×400）に、正常マウスの同切片の顕微鏡写真を図10（倍率×40）及び図12（倍率×400）に示す。

図9には、関節腔の消失、軟骨組織および骨組織の破壊、炎症性細胞の浸潤がみられる。また、更に倍率を上げた図11には、パンスの増生と炎症性細胞の浸潤、関節軟骨の破壊がみられる。

【0019】

〔実施例5〕

関節炎を発症したマウスおよび正常マウス（5～6カ月齢）の後肢の関節の厚さを測定した。関節炎を発症したマウスおよび正常マウスのそれぞれについて15個体ずつ測定に供した。この結果を図13に示す。

図13が示すように、関節炎を発症したマウスは、正常マウスに比べ、後肢足関節の径が増大しており、関節炎による腫張が生じていることがわかる。



【0020】

〔実施例6〕

関節炎を発症したマウスおよび正常マウス（5～6カ月齢）のマウス免疫グロブリンG（IgG）に対するIgM型抗体（リウマチ因子）の力価をELISA法で測定した。関節炎を発症したマウスおよび正常マウスのそれぞれについて15個体ずつ測定に供した。この結果を図14に示す。

図14が示すように、関節炎を発症したマウスは、正常マウスに比べ、有意にリウマチ因子の力価が上昇している。

【0021】

〔実施例7〕

関節炎を発症したマウス及び正常マウス（5～6カ月齢）の牛II型コラーゲンに対する血中抗体の力価をELISA法で測定した。関節炎を発症したマウスおよび正常マウスのそれぞれについて15個体ずつ測定に供した。この結果を図15に示す。

図15が示すように、関節炎を発症マウスでは、高力価の自己抗体が出現している。

【0022】

〔実施例8〕

関節炎を発症したマウス及び正常マウス（5～6カ月齢）の血清IgG濃度をSRID（Single radial immunodiffusion）法で測定した。関節炎を発症したマウスおよび正常マウスのそれぞれについて15個体ずつ測定に供した。この結果を図16に示す。

図16が示すように、関節炎を発症したマウスでは、高ガンマグロブリン血症がみられる。

【0023】

〔実施例9〕

関節炎を発症したマウスより脾臓およびリンパ節細胞の浮遊液を調整し、試験管内でコンカナバリンA存在下で3日間培養し、得られた活性化T細胞 $3 \times 10^7$ 個を正常BALB/cヌードマウス（6週齢）に経静脈的に移入した。細胞移入した

ヌードマウス全個体（7個体）に、移入後2カ月で下肢関節の膨張がみられた。  
3カ月後に実施例4と同様に病理組織標本を作製したところ、図9及び図11と類似した組織像がみられた。

【0024】

【発明の効果】

本発明は、ヒトのリウマチ性関節炎に酷似した病態を自然発症するマウスを提供する。このマウスは、該疾患のモデルマウスとして有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】

関節炎を発症したマウスの前肢の写真である。

【図2】

正常マウスの前肢の写真である。

【図3】

関節炎を発症したマウスの後肢の写真である。

【図4】

正常マウスの後肢の写真である。

【図5】

関節炎を発症したマウスの前肢のレントゲン写真である。

【図6】

正常マウスの前肢のレントゲン写真である。

【図7】

関節炎を発症したマウスの後肢のレントゲン写真である。

【図8】

正常マウスの後肢のレントゲン写真である。

【図9】

関節炎を発症したマウスから作製した関節組織切片の顕微鏡写真（倍率×40）である。

【図10】

正常マウスから作製した関節組織切片の顕微鏡写真（倍率×40）である。

【図11】

関節炎を発症したマウスから作製した関節組織切片の顕微鏡写真（倍率×400）である。

【図12】

正常マウスから作製した関節組織切片の顕微鏡写真（倍率×400）である。

【図13】

関節炎を発症したマウスの後肢足関節の厚さを示す図である。

【図14】

関節炎を発症したマウスのリウマチ因子の力価を示す図である。

【図15】

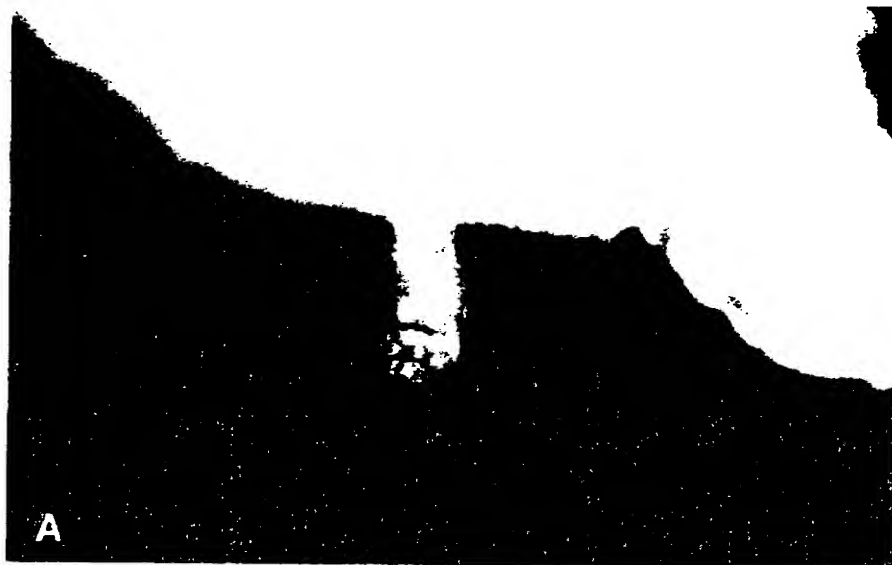
関節炎を発症したマウスの自己抗体の力価を示す図である。

【図16】

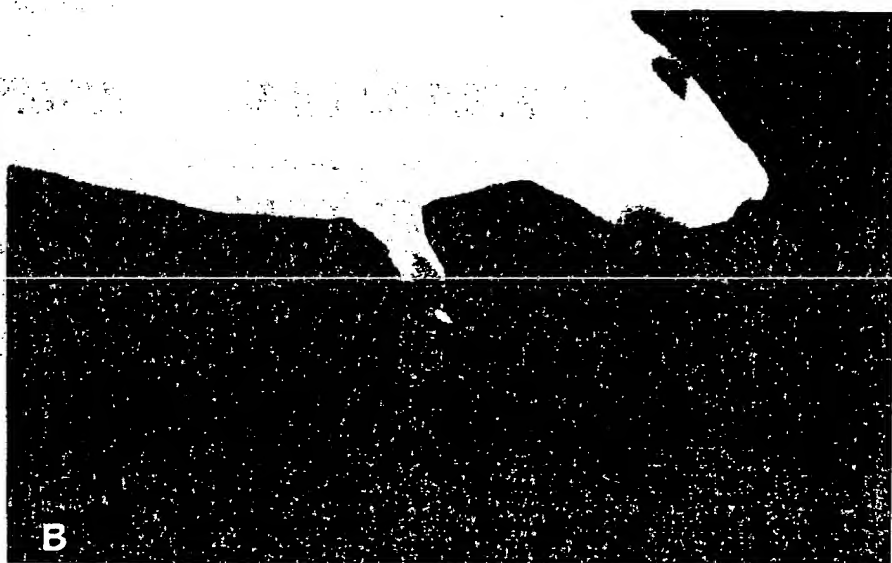
関節炎を発症したマウスの血清IgG濃度を示す図である。

【書類名】 図面

【図1】



【図2】



【図3】



【図4】



【図5】



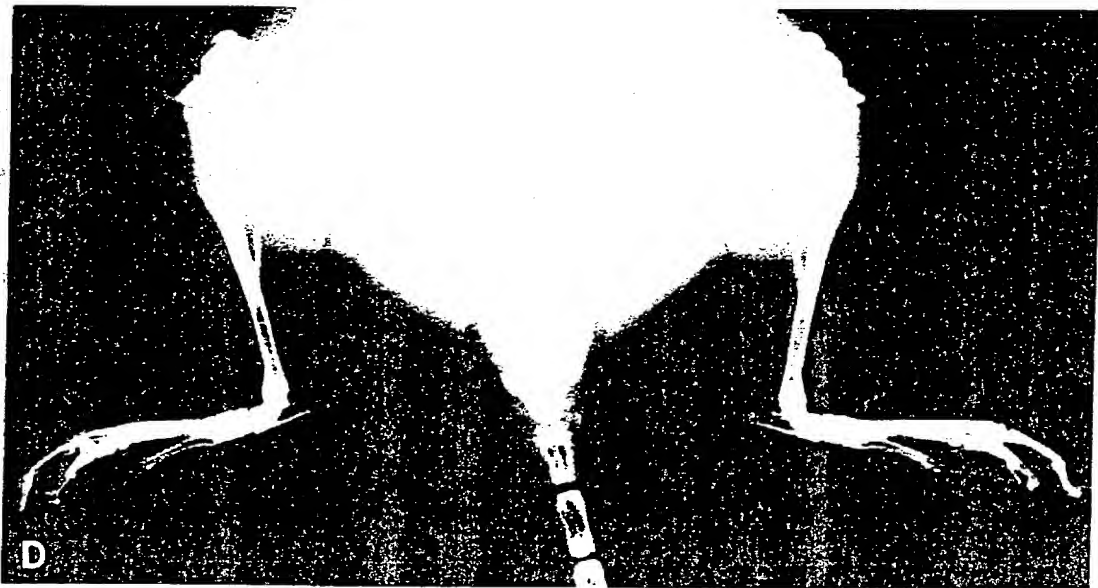
【図6】



【図7】



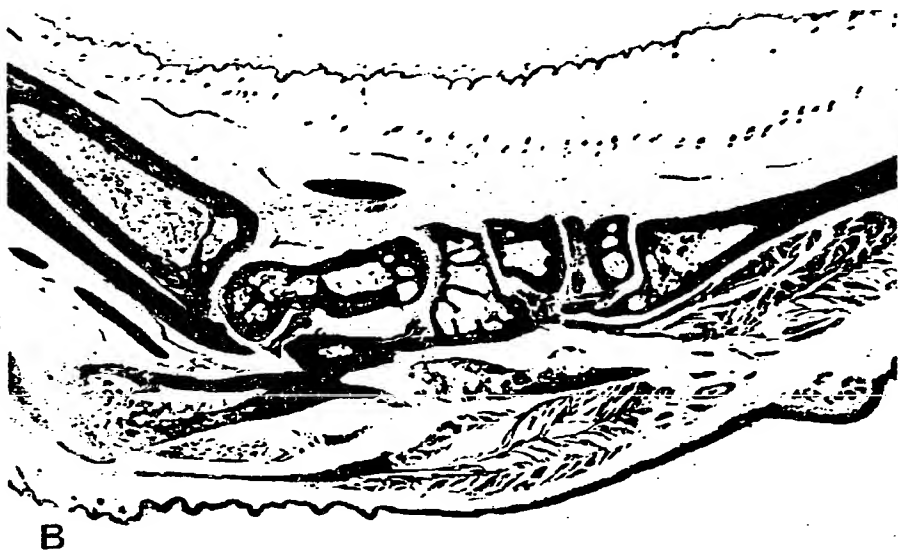
【図8】



【图9】

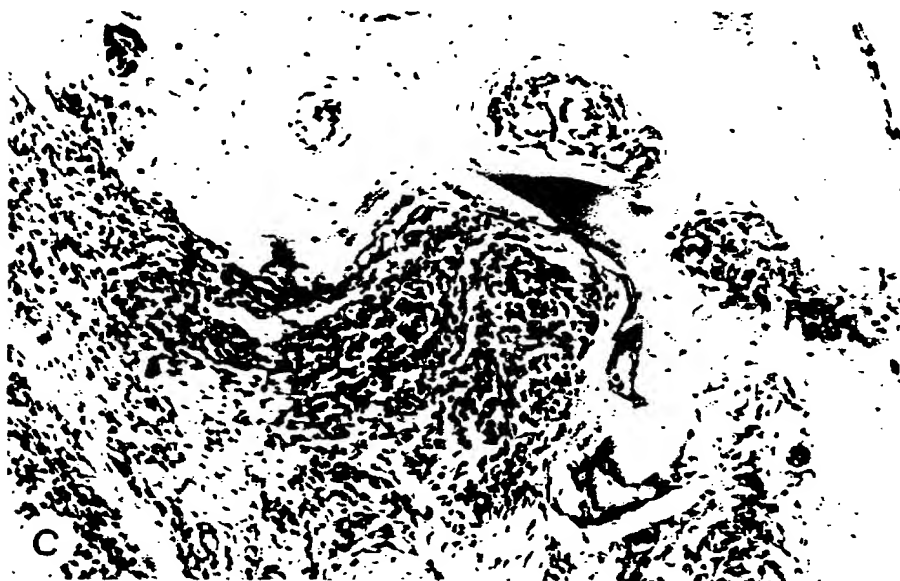


【图10】

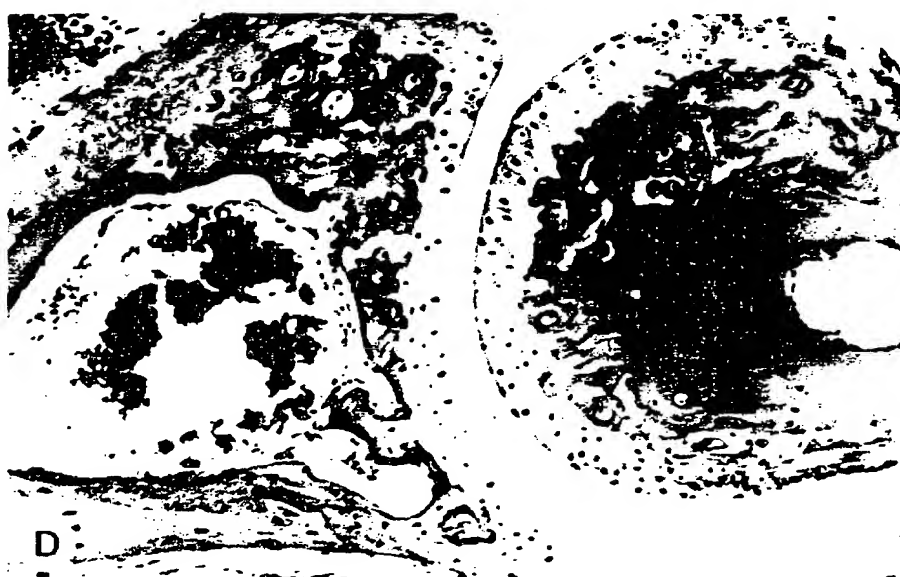




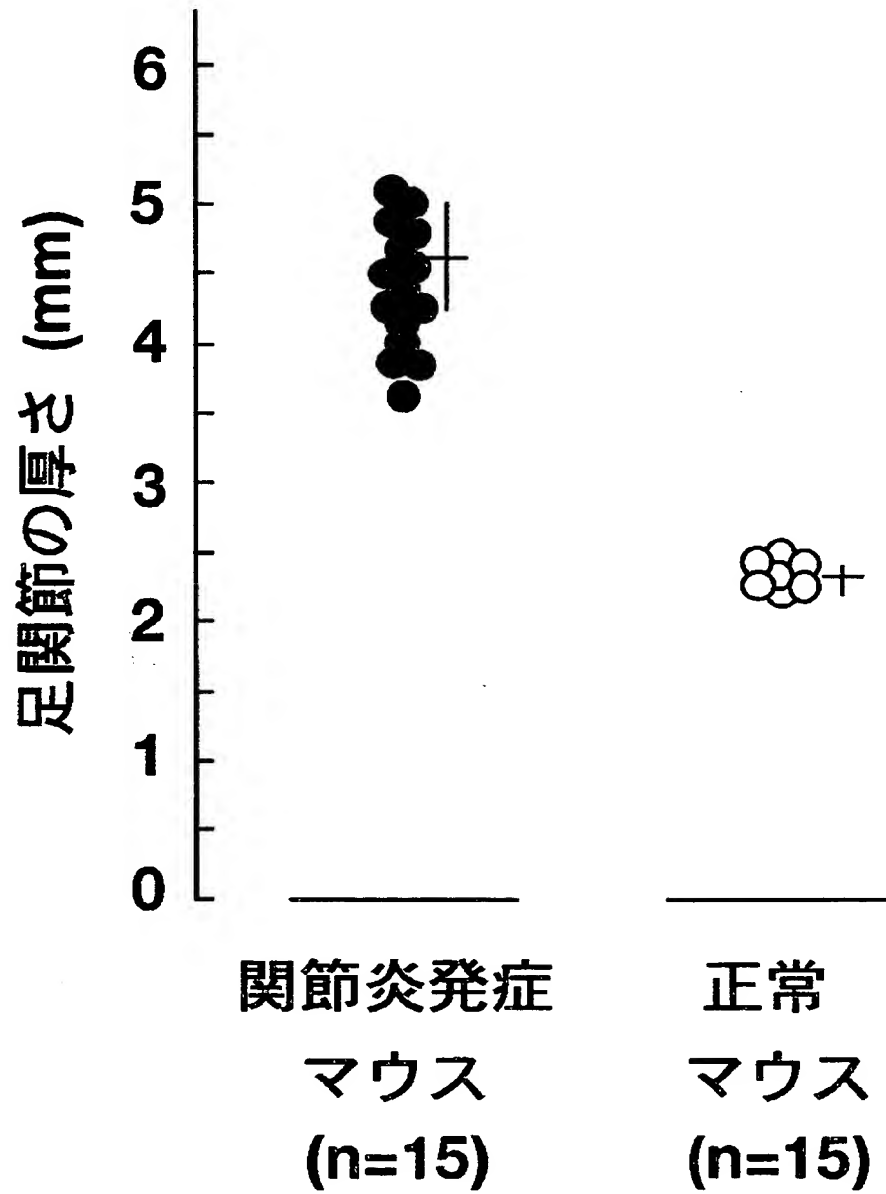
【図11】



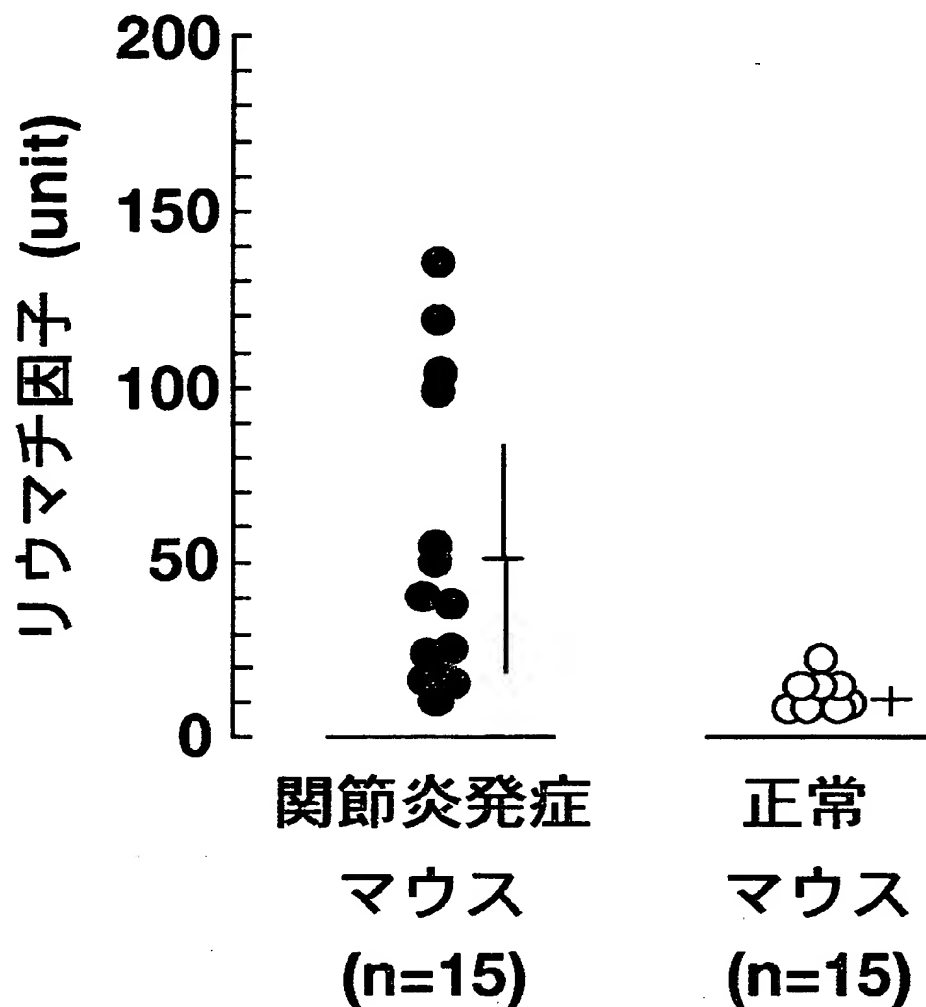
【図12】



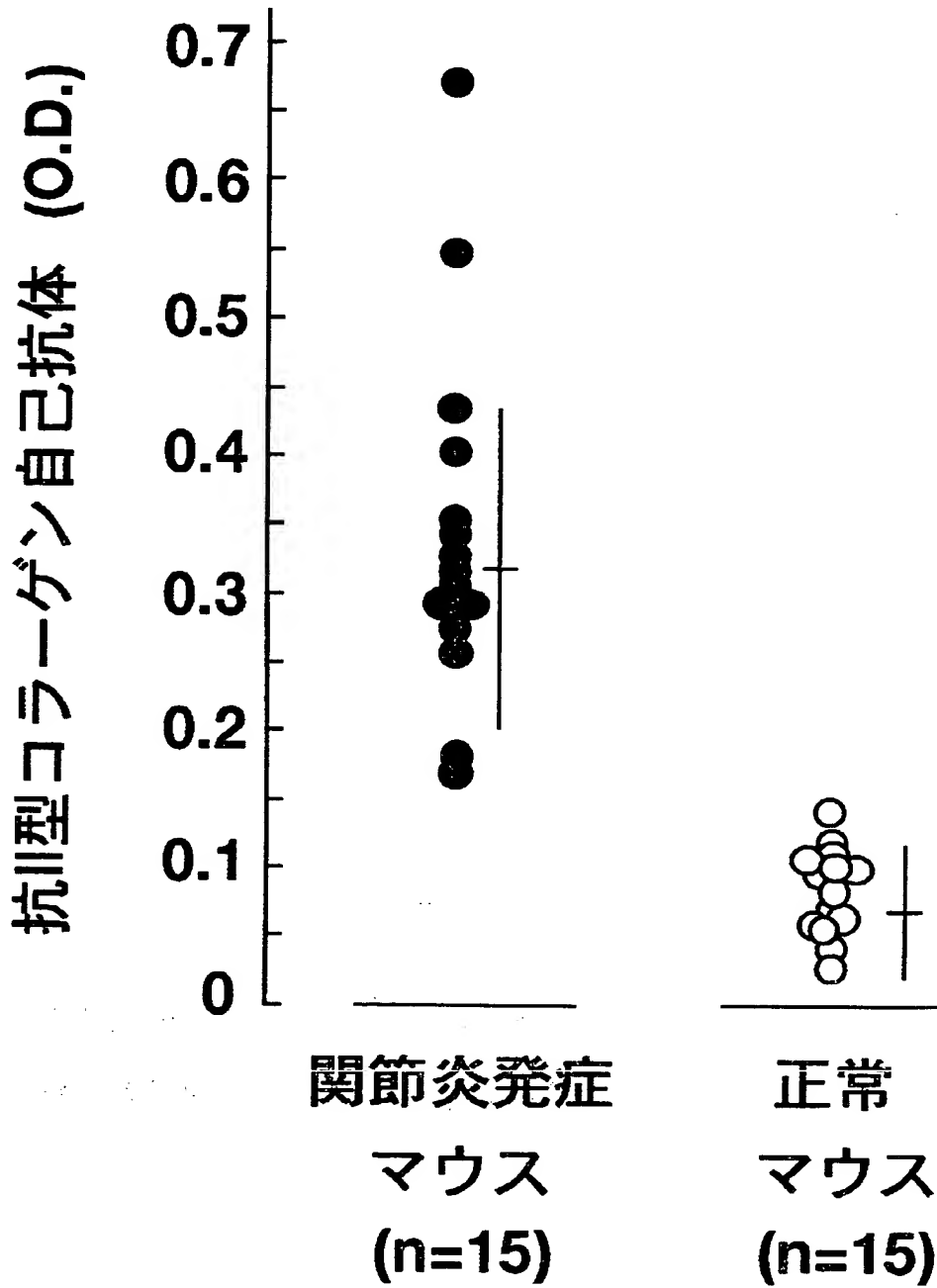
【図13】



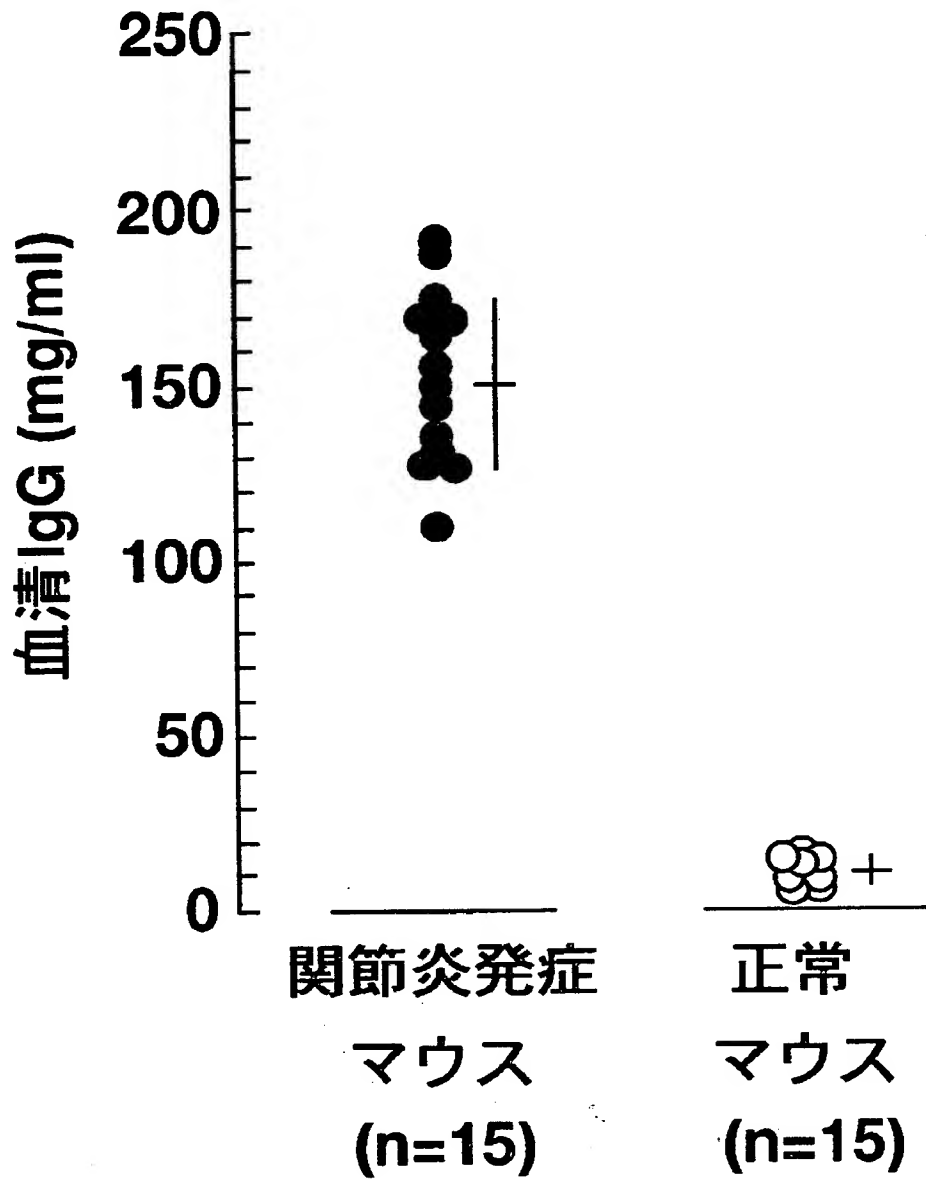
【図14】



【図15】



【図16】



【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 ヒトに発症するリウマチ性関節炎と酷似した病態を示す自己免疫性関節炎を自然発症するマウス。

【効果】 ヒトに発症するリウマチ性関節炎に酷似した病態を自然発症するので、該疾患のモデルマウスとして有用である。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【住所又は居所】 埼玉県川口市本町4丁目1番8号

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【特許出願人】

【識別番号】 594053121

【住所又は居所】 東京都板橋区栄町35番2号

【氏名又は名称】 財団法人東京都老人総合研究所

【代理人】

申請人

【識別番号】 100091096

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階平木国際特許事務所

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【書類名】 手続補正書

【整理番号】 P96-0231

【提出日】 平成 8年10月14日

【あて先】 特許庁長官 殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成 8年特許願第267126号

【補正をする者】

【事件との関係】 特許出願人

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【補正をする者】

【事件との関係】 特許出願人

【識別番号】 594053121

【氏名又は名称】 財団法人東京都老人総合研究所

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 図面

【補正対象項目名】 全図

【補正方法】 変更

【補正の内容】 1



【書類名】 図面

【図1】

図面代用写真



【図2】

図面代用写真



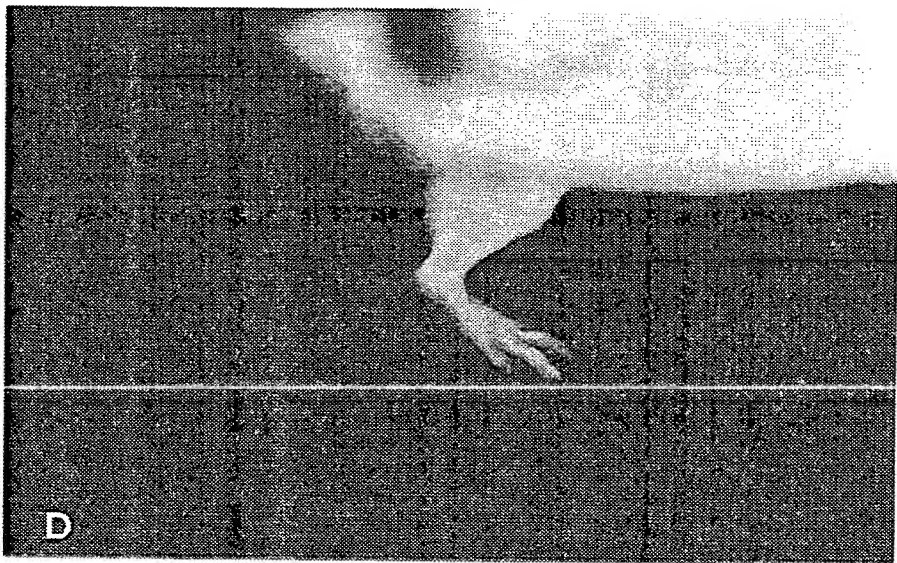
【図3】

図面代用写真



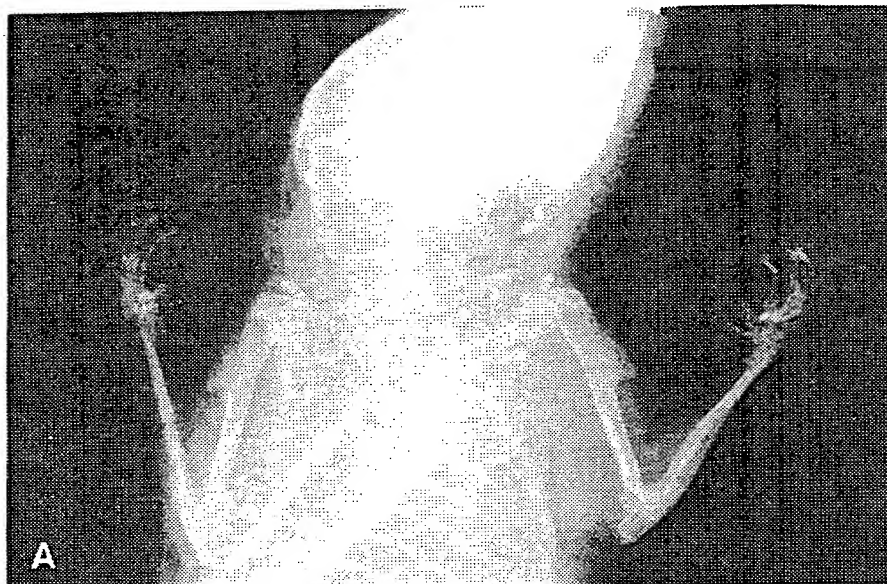
【図4】

図面代用写真



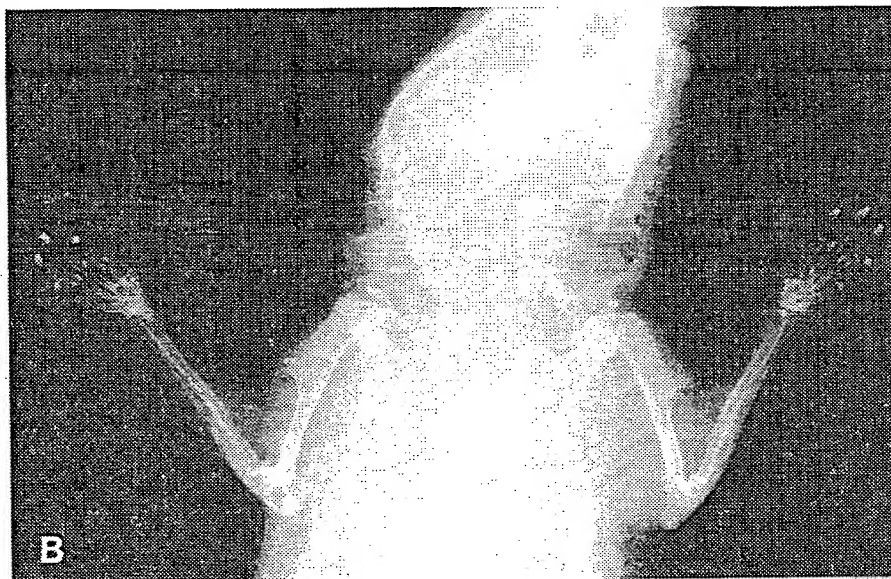
【図5】

図面代用写真



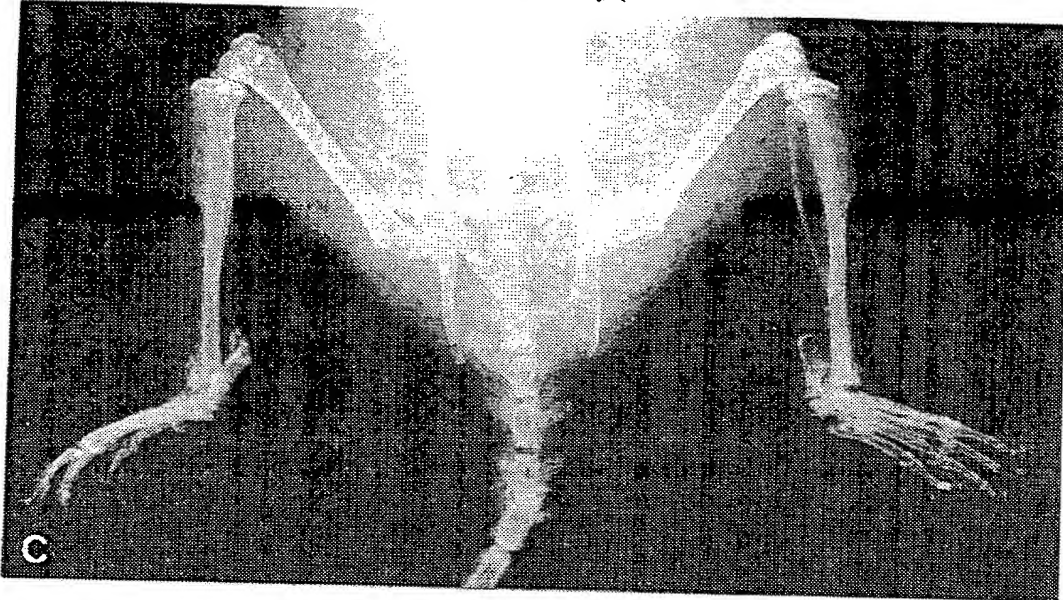
【図6】

図面代用写真



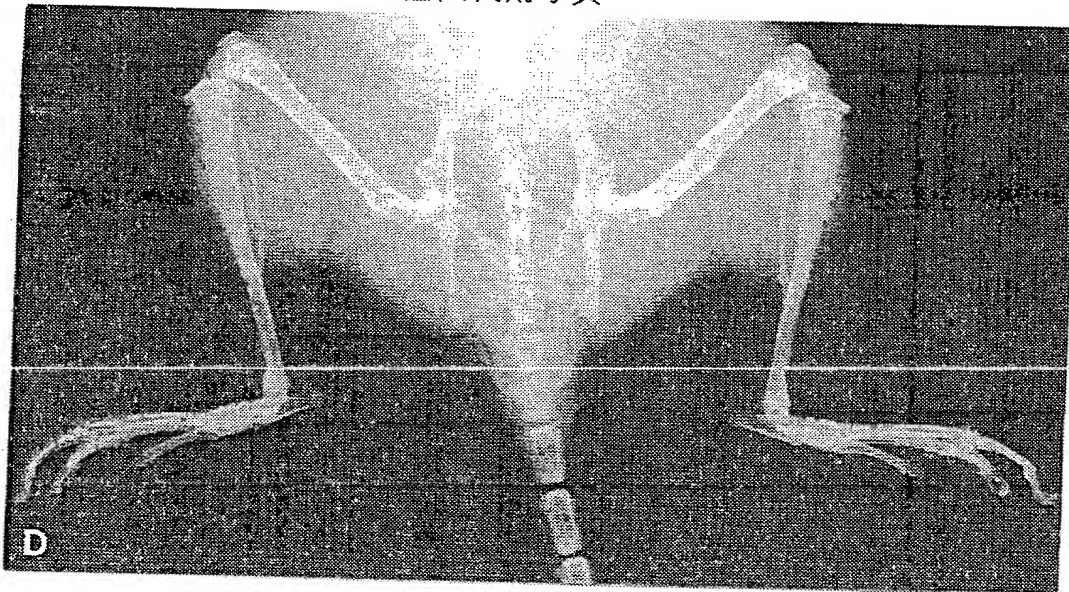
【図7】

図面代用写真



【図8】

図面代用写真





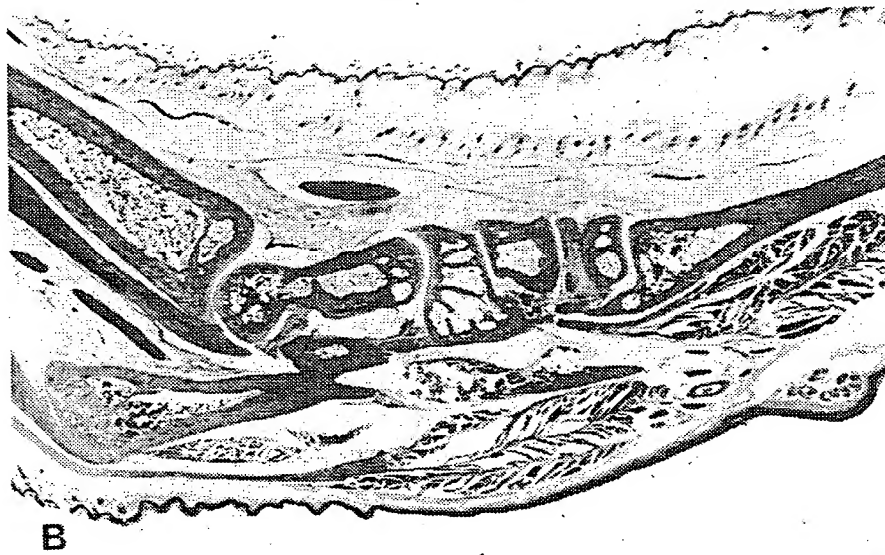
【图9】

図面代用写真



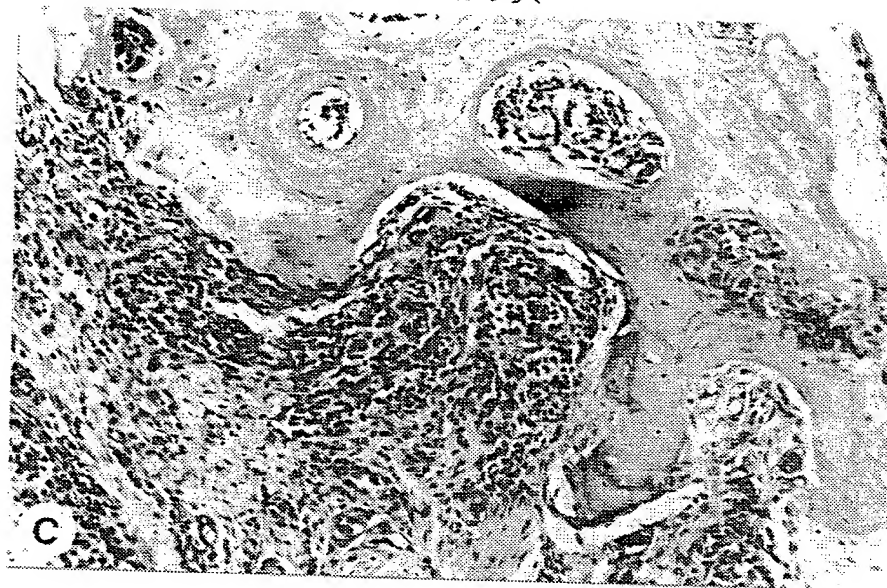
【图10】

図面代用写真



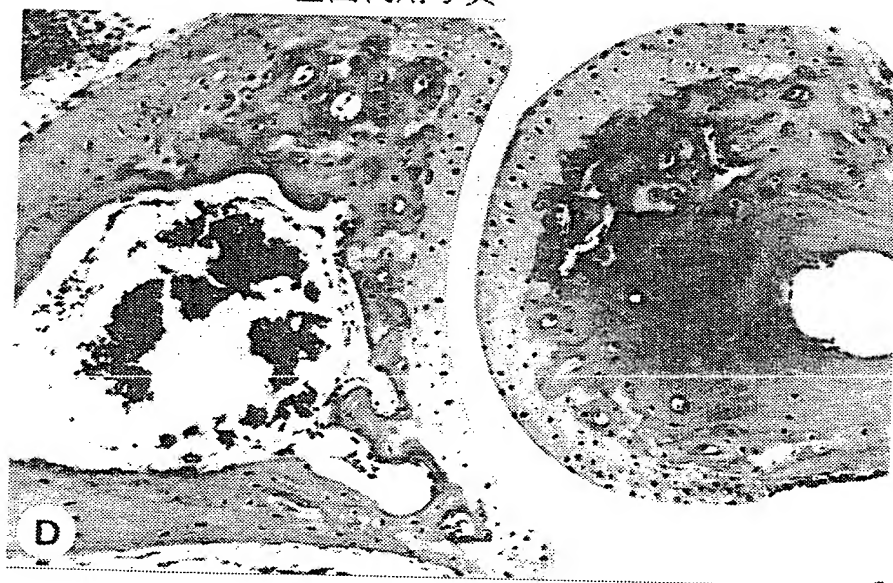
【図11】

図面代用写真

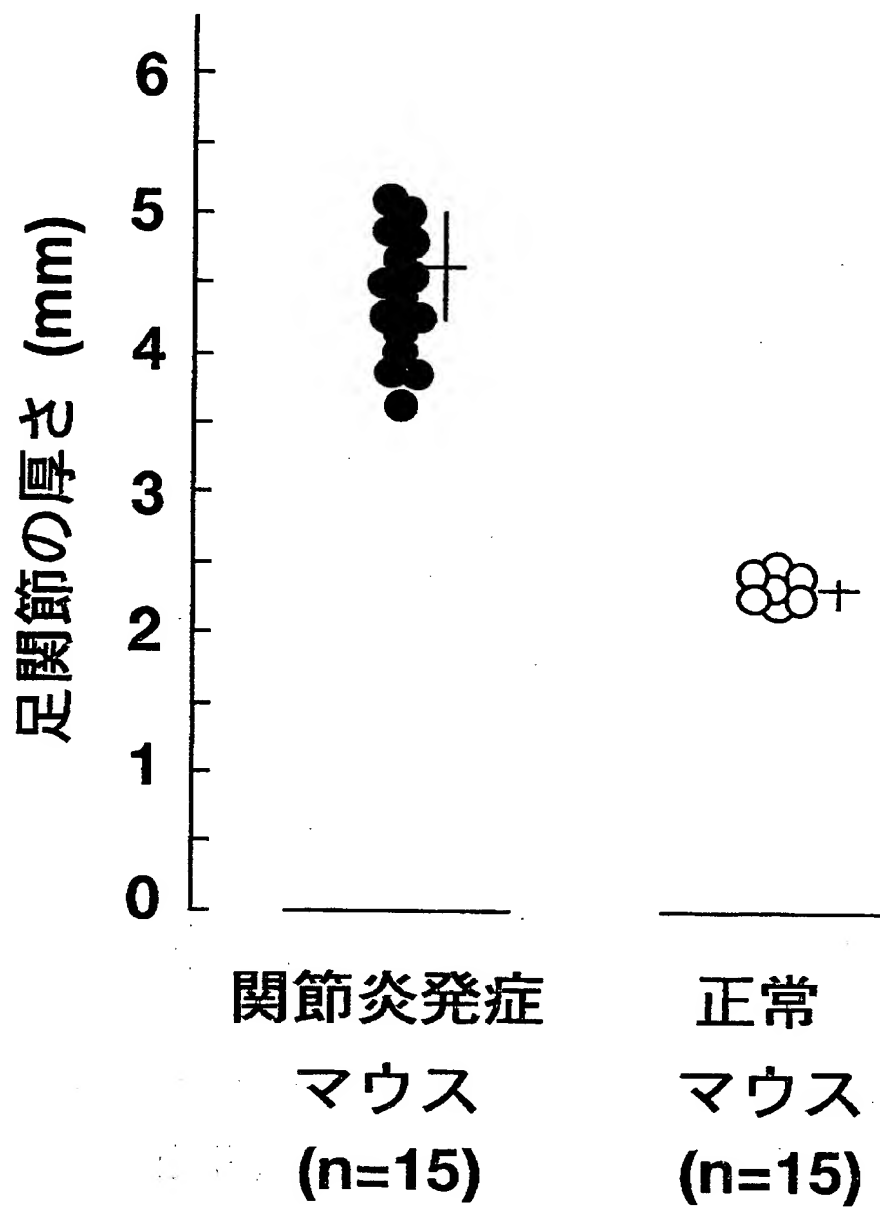


【図12】

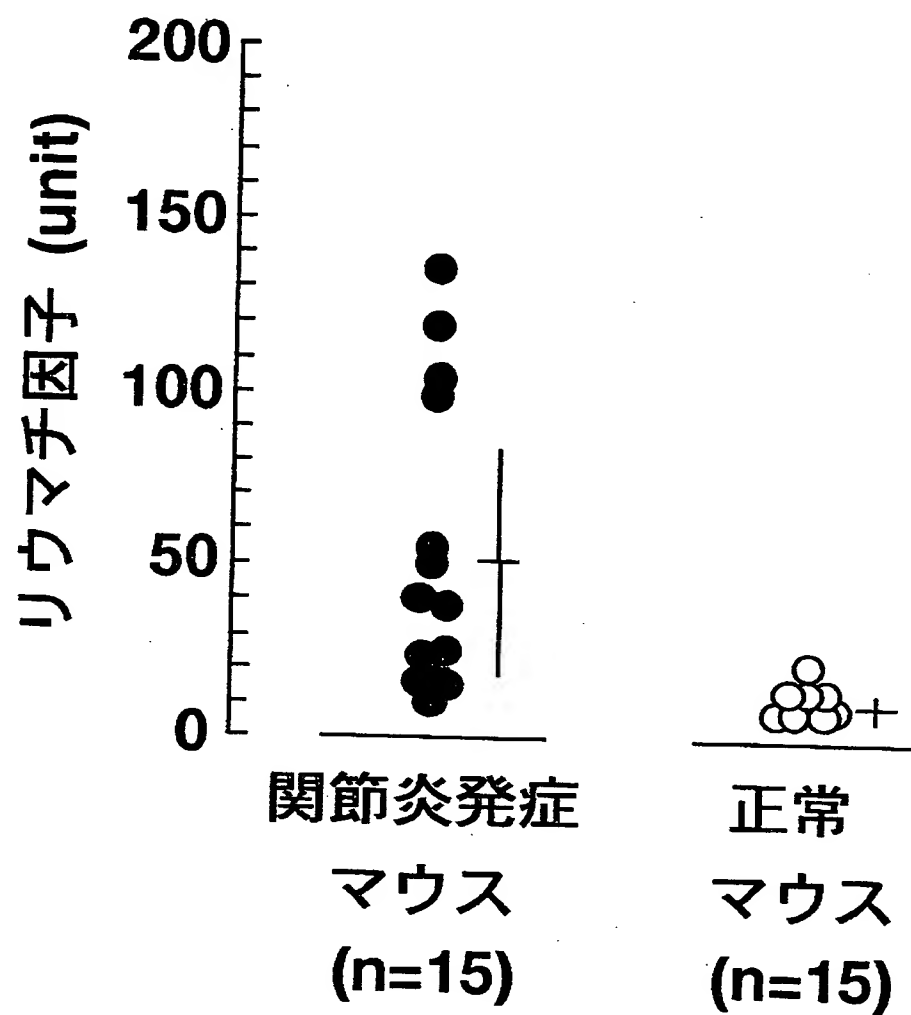
図面代用写真



【図13】

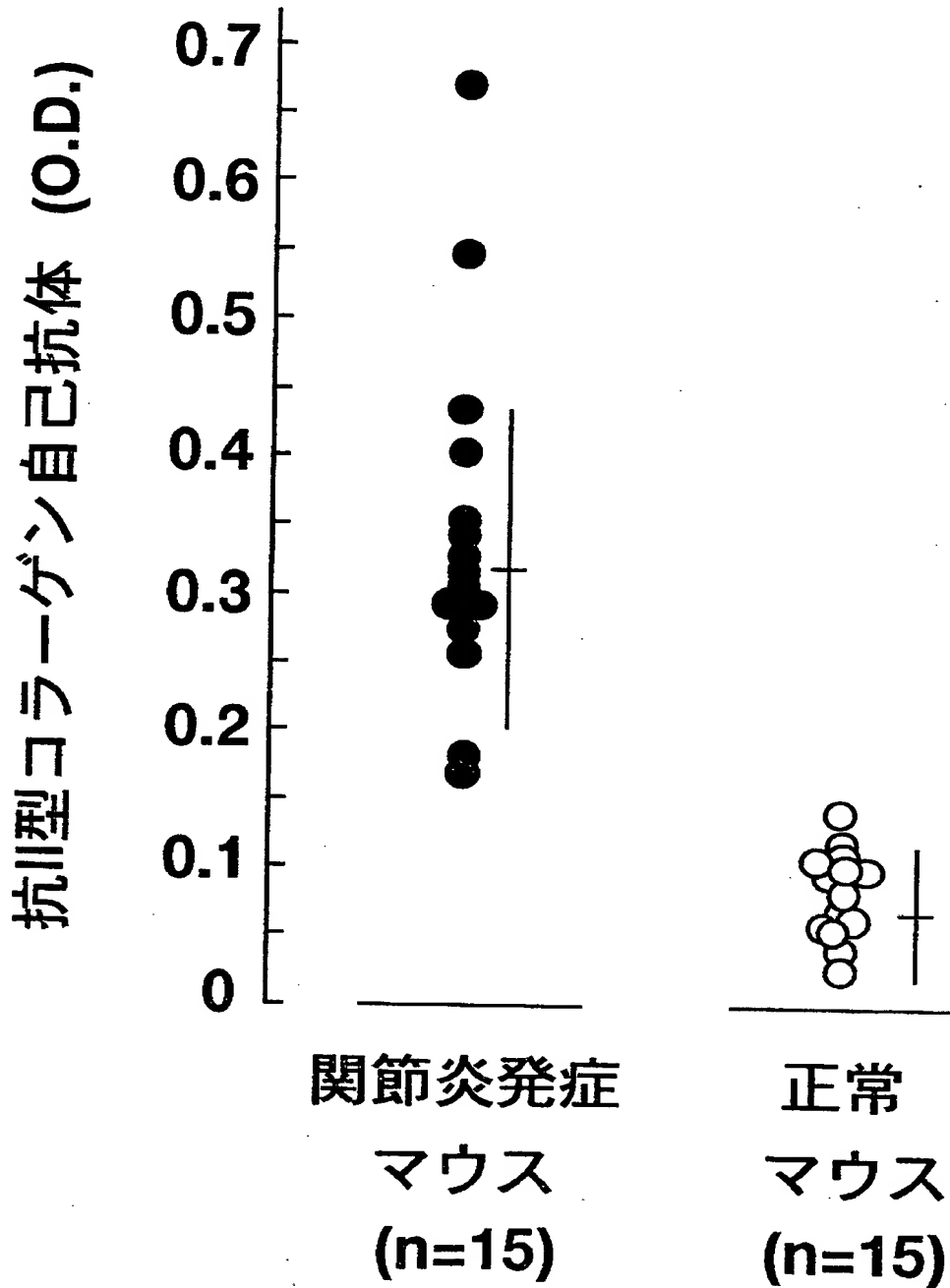


【図14】

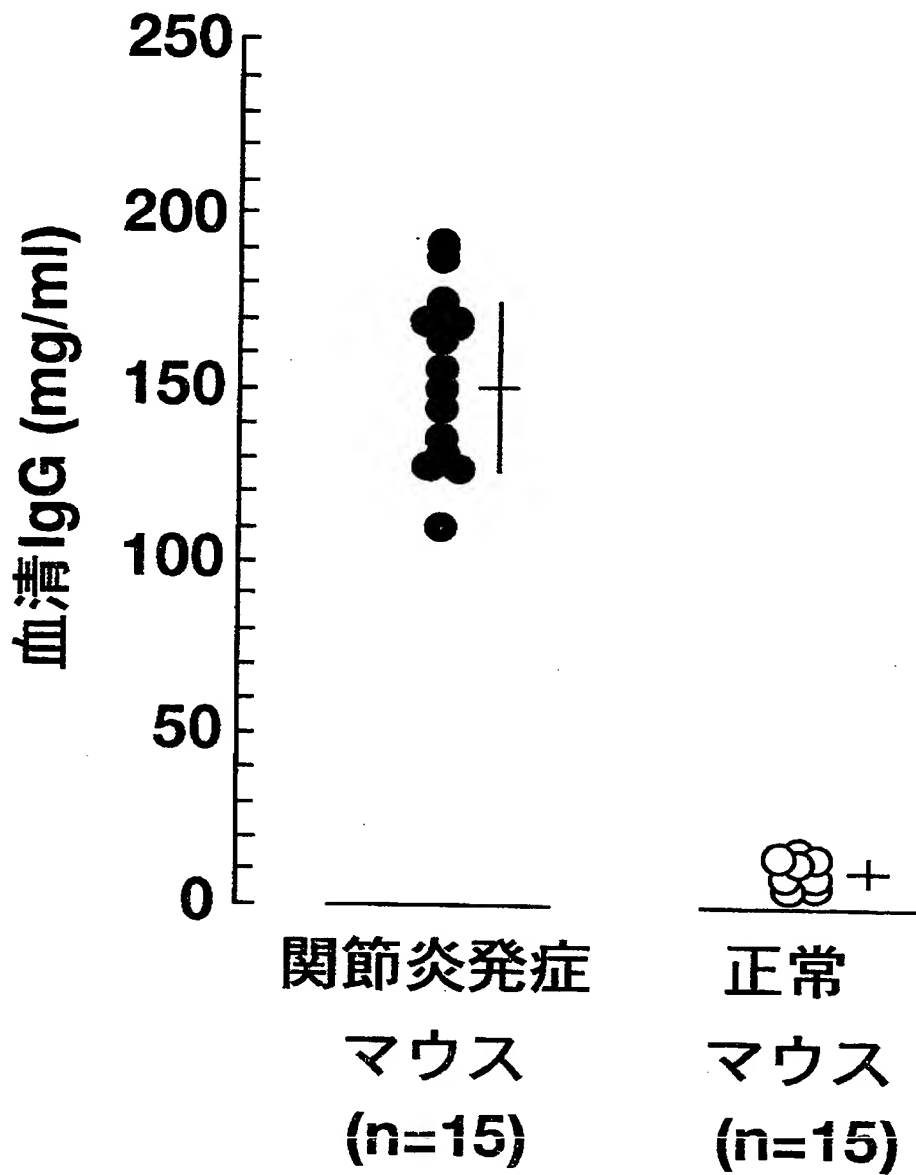




【図15】



【図16】



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [396020800]

1. 変更年月日 1996年 9月18日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号  
氏 名 科学技術振興事業団

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [594053121]

1. 変更年月日	1994年 3月28日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都板橋区栄町35番2号
氏 名	財団法人東京都老人総合研究所